植 物 分 类 学 报 35(2):97~106(1997)
Acta Phytotaxonomica Sinica

松科系统发育的分子生物学证据*

汪小全 韩英 邓峥嵘 洪德元
(中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093)

PHYLOGENY OF THE PINACEAE EVIDENCED BY MOLECULAR BIOLOGY

Wang Xiao-quan Han Ying Deng Zheng-rong Hong De-yuan
(*Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093)

Abstract The molecular phylogeny of the Pinaceae represented by nine species of eight genera was investigated through PCR-RFLP analysis of a cpDNA fragment, which was approximately 2550 bp long and homologous with the DNA fragment from the upstream of rbcL to part of accD in cpDNA of *Pinus thunbergii*. Identified by 18 restriction endonucleases were 86 recognition sites, of which 54 were polymorphic. The restriction site data were analyzed with PAUP (version 3.1.1) and Mega (version 1.01). As a result, the most parsimonious Wagner tree constructed by branch-and-bound search is similar to the neighbor-joining tree in topology. *Cathaya*, *Pinus*, *Larix* and *Pseudotsuga* form a monophyletic group, and *Larix* is closely related to *Pseudotsuga*. *Cathaya* is more closely related to *Pinus* than to *Pseudotsuga* and *Larix*, but the close relationship between *Cathaya* and *Pinus* is not well supported by the bootstrap test. *Abies* has a close relationship to *Keteleeria*. Moreover, the system proposed by Zheng and Fu (1978) that the family Pinaceae was divided into three subfamilies, i.e., Abietoideae, Laricoideae and Pinoideae, is artificial, because the former two are not monophyletic.

Key words Molecular phylogeny; RFLP; rbcL gene; Pinaceae; *Cathaya*

摘要 运用PCR方法分别从松科8属、9种植物中扩增出一长约2550bp的cpDNA片段, 这一片段包括rbcL、trnR、部分accD及基因间的非编码区(相对于黑松cpDNA中的同源片段而言)。运用18种限制性内切酶对这一cpDNA片段进行酶切分析, 共获得86个酶切位点, 其中54个为变异位点。运用PAUP(version 3.1.1)和Mega(version 1.01)软件对数据进行分析, 结果Wagner简约树和Neighbor-Joining树反映出的松科系统发育关系基本一致:银杉属、松属、黄杉属和落叶松属形成一个单系群, 且银杉属与松属的亲缘关系更近于与另外二属的关系, 但这一结果未得到Bootstrap分析的较强支持;落叶松属近缘于黄杉属;冷杉属近缘于油杉属。此外, 松科中的冷杉亚科和落叶松亚科均不是单系类群, 将松科划分为冷杉亚科、落叶松亚科和松亚科三个亚科的系统(郑万钧, 傅立国, 1978)是不自然的。

关键词 分子系统发育; 限制性片段长度多态性; rbcL基因; 松科; 银杉属

---

* 国家自然科学基金资助。
1997-01-10 收稿。

松科 Pinaceae Lindl. 是现存裸子植物中最大的一个类群，也是研究松柏类植物(Conifers) 系统发育的一个关键类群。随着系统学的深入发展及分支分析方法的引入，在松科系统发育方面已积累了丰富的资料：Hart (1987)运用123 个性状对松柏类的 63 个属(包括松科所有 10 个属)进行了分支分析，认为松科是一个很好的单系类群，种子中具树脂道和裂生多胚现象的冷杉属 *Abies*、金钱松属 *Pseudolarix*、油杉属 *Keteleeria*、雪松属 *Cedrus* 和铁杉属 *Tsuga* 分为一支，而内皮层具凯氏带加厚且次生木质部中具树脂道的银杉属 *Cathaya*、松属 *Pinus*、落叶松属 *Larix*、黄杉属 *Pseudotsuga* 和云杉属*Picea* 形成了另一支。Price 等(1987)运用免疫学方法对松科 9 属植物(不含银杉属)进行了系统学研究，并将松科分为两个群：Abietoid group(含油杉属、冷杉属、雪松属、铁杉属和金钱松属)和 Pinoid group(含云杉属、松属、落叶松属和黄杉属)。类似的工作虽对松科的系统发育研究有一定的启示，但其依据的性状存在很大的争论。松科在地质历史时期曾发生十分强烈的分化，但绝大部分类群现已绝灭，现存属间存在很大的间断，具有裸子植物中普遍存在的孤立性，很难得到性状的演化系列。古老性和孤立性势必导致较多的平行演化事件及性状的相关性差，利用形态性状重建其系统发育过程十分困难。八十年代以来，分子生物学技术的飞速发展及其向植物分类学这门古老学科的渗透极大地推动了植物分类学的发展，利用遗传物质(DNA)本身研究植物间的系统进化关系已成为学科的生长点之一。由于作为 DNA 基本单位的碱基具有相对稳定的变异速率，它对揭示裸子植物等古老类群的进化过程起着尤为重要的作用。Chase 等(1993)利用 rbcL 基因序列对 499 种种子植物进行了系统发育重建，其中包括松科 9 属(不含银杉属)13 种；Tsumura 等 (1995) 对松柏类(含松科 9 属，不含银杉属)的 6 个 cpDNA 基因进行了 PCR-RFLP 分析，并构建了系统树。Chase 等和 Tsumura 等的研究均基于高度保守的基因区，且他们的研究中均不包括特产中国的活化石材料——银杉属。本文运用 PCR-RFLP 方法对松科植物的 rbcL-accD 基因片段进行分析，探讨松科植物的属间关系，特别是银杉属的系统位置。

1　材料和方法

表 1　材料来源
Table 1　The origin of materials

类群(缩写) Taxon(Abbreviation)	来 源 Origin
Abies holophylla Maxim. (ABH)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Pseudotsuga menziesii (Mirbel) Franco (PSM)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Picea smithiana (Wall.) Boiss. (PIS)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Keteleeria evelyniana Mast. (KEE)	Botanic Garden, Kunming Institute of Botany(CAS)
Cathaya argyrophylla Chun et Kuang (CAA)	Jinfo Mountain, Nanchuan, Sichuan
Pinus armandi Franch. (PIA)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Pinus banksiana Lamb. (PIB)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Larix olgensis Henry (LAO)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Cedrus deodara (Roxb.) G. Don (CED)	Botanic Garden, Institute of Botany(CAS)
Pseudolarix amabilis (Nelson) Rehd. (PSA)	Botanic Garden, Kunming Institute of Botany(CAS)
Tsuga chinensis (Franch.) Pritz. (TSC)	Botanic Garden, Kunming Institute of Botany(CAS)

1.1 材料来源

用于 DNA 提取的材料为新鲜或硅胶干燥的针叶，详见表 1。

1.2 总 DNA 提取

总 DNA 提取方法参照 Rogers & Bendich(1988)的方法，并稍作改进，即将 1V CTAB 沉淀液沉淀 DNA 这一步骤改为 1V 异丙醇沉淀 DNA。

1.3 PCR 反应

扩增反应在 PE 公司的 9600 型 PCR 仪上进行，反应体积 50μl，内含 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.3)，0.25 g/L BSA，2 mmol/L $MgCl_2$，1.5 u Taq DNA 聚合酶(购自北京农业大学)，dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 200 μmol/L，30～50 ng 总 DNA，引物 P_1 和 P_2 各 12.5 pmols。P_1 的序列同黑松 *Pinus thunbergii* rbcL 基因 5'端的 1～25 个碱基，即 5' ATG TCA CCA AAA ACA GAG ACT AAA G 3'（Wakasugi *et al*., 1994)；P_2 与黑松叶绿体基因组 41904～41925 区域(aacD 基因中)同源，其序列为 5' ACT ACA GAT CTC ATA CTA CCC C 3'。扩增程序为：70 ℃，4 min→94 ℃，2 min；50 ℃，20 s；72 ℃，150 s；两个循环→94 ℃，20 s；50 ℃，20 s；72 ℃，150 s；36 个循环→72 ℃，6 min。

1.4 限制性内切酶消化

实验选用 Ava Ⅱ、BamH Ⅰ、Bgl Ⅱ、Bsp1286 Ⅰ、BstN Ⅰ、EcoR Ⅴ、Hae Ⅲ、Hha Ⅰ、Hind Ⅲ、Hinf Ⅰ、Msp Ⅰ、Pst Ⅰ、Rsa Ⅰ、Sac Ⅰ、Sph Ⅰ、Sty Ⅰ、Taq Ⅰ、Xba Ⅰ共 18 种限制性内切酶分别进行单酶切，为判断一些疑难位点的确切位置，还采用了 BstN Ⅰ + EcoR Ⅴ、Hha Ⅰ + BamH Ⅰ、Msp Ⅰ + Bsp1286 Ⅰ、Msp Ⅰ + Hind Ⅲ、Rsa Ⅰ + Sac Ⅰ、Sty Ⅰ + EcoR Ⅴ 及 Taq Ⅰ + Hind Ⅲ 共 7 种双酶切。酶解反应体积为 20μl，内含 3～5 μl PCR 产物，2～3 单位限制性内切酶和 1× 内切酶反应 buffer。酶解反应时间为 2 hr.。

1.5 琼脂糖凝胶电脉

电泳在 1.5%～2.0% 的琼脂糖凝胶中进行，电泳 buffer 为 1×TBE。电泳结束后，直接在 FOTODYNE 型透射紫外灯上照相。

1.6 数据分析

根据限制性内切酶位点的有无得到 1(位点存在)、0(位点不存在)数据矩阵，然后用 PAUP 软件(Swofford, 1993)中的分支界限法(branch-and-bound)和 MEGA(Kumar *et al*., 1993)软件中的 Neighbor-Joining (NJ)方法分别进行分析。运用 PAUP 分析时，分别用变异位点和有信息的位点(位点有和无中的每一状态至少被两个以上分类群所共享)参与分析。此外，由于裸子植物科间的间断大，外类群极难选择(作者曾尝试用杉科植物作外类群，但均因遗传变异太大，参与分析不合适)，因而 PAUP 分析中未用外类群。为进一步判断 Wagner 简约树中各分支的可信度，采用了 Bootstrap 分析方法。MEGA 软件分析中，先将数据的 1、0 状态换为两种碱基状态，再以 P-distance 计算遗传距离。因 P-distance 计算的是碱基替代的百分率，因此所有的限制性内切酶位点均参与分析。

2 实验结果

由 P_1 和 P_2 扩出的 rbcL-accD 基因片段在松科 8 属植物(*Tsuga* 和 *Pseudolarix* 除外)中无明显长度差异，均长约 2550 bp，包括 rbcL 基因 1425 bp(Hipkins *et al*., 1990)，其余

表 2 86 个限制性内切酶位点在松科 8 属、9 种植物中的分布

Table 2 The distribution of 86 restriction sites in nine species of eight genera in the Pinaceae

编号 NO.	内切酶 RE[1)]	识别序列 RS[2)]	切点 CP[3)]	变异位点 VS[4)] character	信息位点 IS[5)]	分布(Distribution) ABH	PSM	PIS	KEE	CAA	PIA	PIB	LAO	CED
1	Hinf I	G! ANTC	36			1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	EcoR V	GAT! ATC	106	1		1	1	0	1	1	1	1	1	1
3	Msp I	C! CGG	138	2	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
4	BstN I	CC! WGG	138	3	2	1	1	1	0	0	1	0	1	1
5	Hinf I	G! ANTC	179			1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	Msp I	C! CGG	189			1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	Rsa I	GT! AC	193			1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	Ava II	G! GWCC	198			1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	Ava II	G! GWCC	210			1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	Taq I	T! CGA	231	4	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0
11	Taq I	T! CGA	261			1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	Hae III	GG! CC	266	5	4	0	1	0	0	0	0	0	1	0
13	Bsp1286 I	GDGCH! C	267	6	5	1	0	1	1	1	1	0	0	1
14	BstN I	CC! WGG	273	7		0	1	1	1	1	1	1	1	1
15	Hinf I	G! ANTC	283	8	6	0	1	0	0	1	1	0	1	1
16	Taq I	T! CGA	324			1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	Hinf I	G! ANTC	378	9		1	1	1	1	0	1	1	1	1
18	Hae III	GG! CC	386			1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	Bsp1286 I	GDGCH! C	397	10		0	1	1	1	1	1	1	1	1
20	BamH I	G! GATCC	417	11	7	0	1	0	0	0	0	0	1	0
21	Hinf I	G! ANTC	418	12	8	1	0	1	1	1	1	1	0	1
22	Ava II	G! GWCC	449			1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	Taq I	T! CGA	471	13		0	0	0	0	0	0	0	1	0
24	Hae III	GG! CC	498	14	9	1	1	1	0	0	0	0	1	1
25	Rsa I	GT! AC	517			1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	Hae III	GG! CC	545	15		0	0	1	0	0	0	0	0	0
27	Hinf I	G! ANTC	588	16		1	1	1	1	1	1	1	1	0
28	Taq I	T! CGA	591	17		1	1	1	1	1	1	1	1	0
29	Sty I	C! CWWGG	600	18		1	1	1	1	1	1	0	1	1
30	Hha I	GCG! C	639			1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	Pst I	CTGCA! G	733			1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	Rsa I	GT! AC	736			1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	Hae III	GG! CC	864	19		0	1	1	1	1	1	1	1	1
34	Hha I	GCG! C	887			1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	Sph I	GCATG! C	896			1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	Taq I	T! CGA	903	20		1	0	0	0	0	0	0	0	0
37	Sph I	GCATG! C	928	21	10	0	1	0	0	1	0	0	1	0
38	Rsa I	GT! AC	939			1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	Msp I	C! CGG	963			1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	Msp I	C! CGG	984	22	11	1	1	0	1	0	1	1	1	1
41	Rsa I	GT! AC	988			1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	Taq I	T! CGA	1072			1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	BstN I	CC! WGG	1116			1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	Bgl II	A! GATCT	1176	23		1	1	1	1	0	1	1	1	1

Cont.

编号 NO.	内切酶 RE[1]	识别序列 RS[2]	切点 CP[3]	变异位点 VS[4] character	信息位点 IS[5]	分布(Distribution) ABH	PSM	PIS	KEE	CAA	PIA	PIB	LAO	CED
45	Hinf I	G! ANTC	1190			1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	Rsa I	GT! AC	1197	24		1	0	1	1	1	1	1	1	1
47	Bsp1286 I	GDGCH! C	1227	25	12	0	0	0	0	1	0	0	1	0
48	Sty I	C! CWWGG	1229			1	1	1	1	1	1	1	1	1
49	Hha I	GCG! C	1243	26		0	0	0	0	0	0	0	1	0
50	Msp I	C! CGG	1245	27		0	1	0	0	0	0	0	0	0
51	BstN I	CC! WGG	1245			1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	Taq I	T! CGA	1261	28		0	0	1	0	0	0	0	0	0
53	Xba I	T! CTAGA	1270	29	13	0	1	1	0	1	1	1	1	1
54	Hind III	A! AGCTT	1275			1	1	1	1	1	1	1	1	1
55	Rsa I	GT! AC	1284			1	1	1	1	1	1	1	1	1
56	Hind III	A! AGCTT	1341	30	14	1	0	0	0	1	1	1	0	0
57	Hinf I	G! ANTC	1354			1	1	1	1	1	1	1	1	1
58	Ava II	G! GWCC	1455	31		0	0	0	0	0	0	0	0	1
59	Hinf I	G! ANTC	1456	32	15	0	1	0	0	1	1	1	1	0
60	Msp I	C! CGG	1459	33		0	0	0	0	0	0	0	0	1
61	Hae III	GG! CC	1462	34	16	0	0	1	1	1	1	1	1	1
62	Hinf I	G! ANTC	1475	35	17	1	0	1	0	0	0	0	0	0
63	Hae III	GG! CC	1494	36		0	1	0	0	0	0	0	0	0
64	Bgl II	A! GATCT	1510	37	18	0	1	1	1	1	0	0	1	1
65	EcoR V	GAT! ATC	1527	38	19	1	1	1	0	1	1	1	0	1
66	Sty I	C! CWWGG	1600	39	20	0	0	0	0	0	1	1	0	0
67	Taq I	T! CGA	1600	40		1	0	0	0	0	0	0	0	0
68	Taq I	T! CGA	1651	41		1	1	1	1	1	0	1	1	1
69	Sac I	GAGCT! C	1710	42		1	1	1	1	1	1	1	1	0
70	Bsp1286 I	GDGCH! C	1720			1	1	1	1	1	1	1	1	1
71	Taq I	T! CGA	1730			1	1	1	1	1	1	1	1	1
72	Sty I	C! CWWGG	1740	43		0	0	0	0	0	0	0	0	1
73	Msp I	C! CGG	1753			1	1	1	1	1	1	1	1	1
74	Ava II	G! GWCC	1755			1	1	1	1	1	1	1	1	1
75	Hha I	GCG! C	1811	44		0	0	0	0	1	0	0	0	0
76	BstN I	CC! WGG	1860	45		0	0	0	0	1	0	0	0	0
77	Msp I	C! CGG	1870	46	21	0	1	1	0	0	1	1	1	1
78	BamH I	G! GATCC	1926	47		0	0	0	0	1	0	0	0	0
79	Taq I	T! CGA	1990	48	22	1	0	0	0	0	0	0	0	1
80	Msp I	C! CGG	2070	49		0	1	0	0	0	0	0	0	0
81	Msp I	C! CGG	2095	50		0	0	0	0	1	0	0	0	0
82	Bsp1286 I	GDGCH! C	2170	51	23	0	0	0	0	0	1	1	0	0
83	Taq I	T! CGA	2190			1	1	1	1	1	1	1	1	1
84	Rsa I	GT! AC	2300	52		1	1	1	0	1	1	1	1	1
85	Xba I	T! CTAGA	2340	53	24	1	1	1	0	1	1	1	1	0
86	Taq I	T! CGA	2375	54	25	1	0	0	1	1	1	1	1	1

1)RE: Restriction enzyme; 2)RS: Recognition site; 3)CP: Cutting position; 4)VS: Variable site; 5)IS: Informative site.

长度包括 trnR、accD 的一部分及基因间的非编码区。此外，各属的 PCR 扩增产物中均有两个小分子片段，一个长约 1600 bp，另一个长约 950 bp，提高扩增的退火温度至 60 ℃，这

两个片段也不消失。Chase 等(1993)在 rbcL 基因的研究中发现很多类群具有 rbcL 假基因(如近乎所有的苏铁类植物),松科中的这两个小片段是否为假基因,值得进一步研究。*Tsuga* 和 *Pseudolarix* 较特殊,其 DNA 模板在其它基因(如 rDNA 中的 26s 和 cpDNA 中的 trnk 基因)的扩增中均获得很好的效果,但多次调节扩增程序均扩不出 rbcL-accD 基因片段,估计引物 P_2 不匹配,因此这两个属未置于后面的分析中。

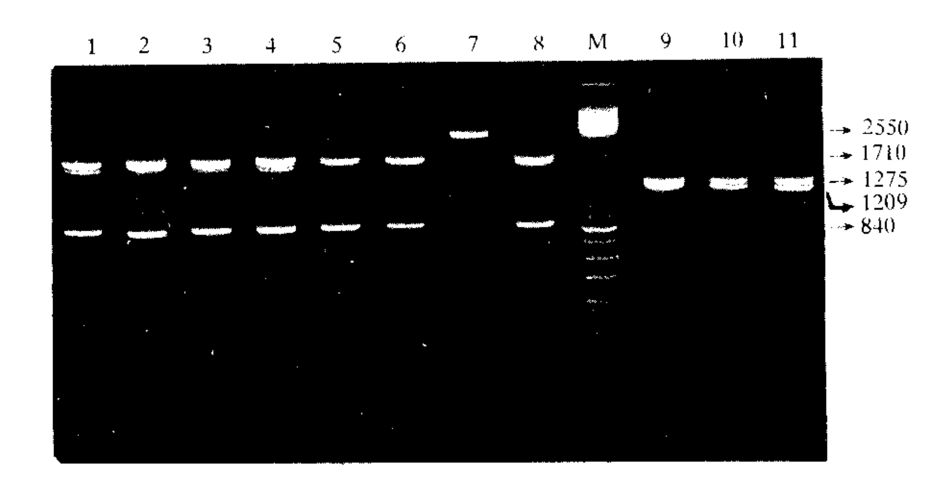


图 1 松科 rbcL-accD 基因片段的 PCR-RFLP 分析 1~8. Sac Ⅰ 酶切; M. 100 bp DNA Ladder; 9~11. Hind Ⅲ 酶切.
Fig. 1 PCR-RFLP analysis of the rbcL-accD gene fragment in the Pinaceae 1~8. Sac Ⅰ digestion; M. 100 bp DNA Ladder; 9~11. Hind Ⅲ digestion. 1. *Abies holophylla*; 2, 9. *Pseudotsuga menziesii*; 3. *Larix olgensis*; 4. *Picea smithiana*; 5. *Pinus armandi*; 6, 10. *Pinus banksiana*; 7. *Cedrus deodara*; 8, 11. *Cathaya argyrophylla*.

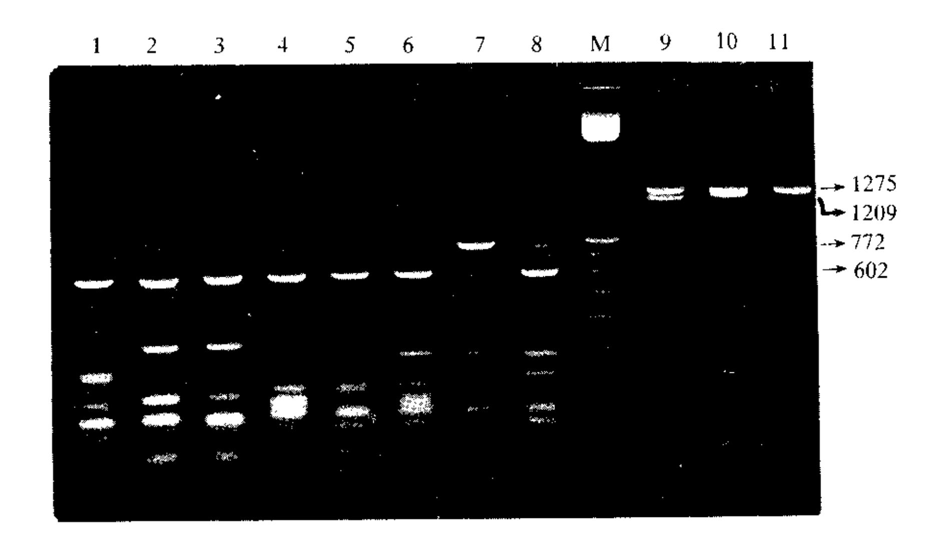


图 2 松科 rbcL-accD 基因片段的 PCR-RFLP 分析 1~8. Hinf Ⅰ 酶切; M. 100bp DNA Ladder; 9~11. Hind Ⅲ 酶切.
Fig. 2 PCR-RFLP analysis of the rbcL-accD gene fragment in the Pinaceae 1~8. Hinf Ⅰ digestion; M. 100 bp DNA Ladder; 9~11. Hind Ⅲ digestion. 1, 9. *Abies holophylla*; 2. *Pseudotsuga menziesii*; 3, 10. *Larix olgensis* 4. *Picea smithiana*; 5. *Pinus armandi*; 6. *Pinus banksiana*; 7, 11. *Cedrus deodara*; 8. *Cathaya argyrophylla*.

大部分单酶切结果易于分析，如图 1 及图 2 中的 9、10、11 三个样品；Hinf Ⅰ的酶切产物中含很多小分子片段(图 2)，琼脂糖凝胶的分辨率不够，结果仅分析了 rbcL-accD 基因片断中 1～1500 bp 区域内的位点；另有一些酶的切点不好判断时，采用了双酶切(图 3)。18 种内切酶的单酶切及部分组合双酶切共获得 86 个位点，其中 54 个为变异位点，变异位点中含 25 个 informative 位点。所有内切酶位点在松科 8 属、9 种植物中的分布见表 2 (Table 2)。

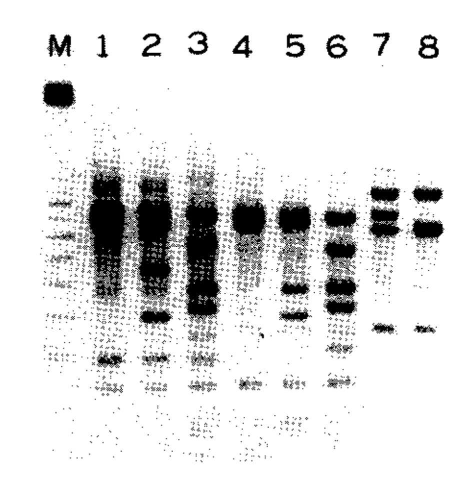


图 3　松科 rbcL-accD 基因片段的双酶切

Fig.3　Double digestion of the rbcL-accD gene fragment in the Pinaceae　M. 100 bp DNA Ladder; 1,2. *Larix olgensis*; 3. *Pinus armandi*; 4～6. *Pinus banksiana*; 7～8. *Cathaya argyrophylla*. 1,4. Msp Ⅰ; 2,5. Msp Ⅰ + Hind Ⅲ; 3,6. Msp Ⅰ + Bsp1286 Ⅰ; 7. Hha Ⅰ; 8. Hha Ⅰ + BamH Ⅰ

用于 PAUP 分析的数据矩阵见表 3。用 54 个变异位点和 25 个 informative 位点分别

表 3　用于 PAUP 分析的数据矩阵

Table 3　Data matrix used in the PAUP analysis

类群(Taxon)	性状(Characters)
Abies holophylla	101001001001010111010111000001000010010111000001000111
Pseudotsuga menziesii	101010111110010111101110001010010001110011000100100110
Picea smithiana	001001101101011111100011000110000110110011000100000110
Keteleeria evelyniana	100001101101000111100111000000000100100011000000000001
Cathaya argyrophylla	110001110101000111101001100011010100110011011010010111
Pinus armandi	101101111101000111100111000011010100011001000100001111
Pinus banksiana	110100101101000110100111000011010100011011000100001111
Larix olgensis	101010111110110111101111110010010100100011000100000111
Cedrus deodara	101001111101010001100111000010101100110010100101000101

进行分析，各得到一个最简约的 Wagner 树，且两个树的结构完全一致(图 4)。运用 Bootstrap 检验方法对数据进行 100 次重抽样分析，结果强烈支持松属二种间的亲缘关系以及落叶松属和黄杉属间的亲缘关系。用 NJ 方法构建的系统树如图 5 所示，与 Wagner 简约树基本一致。

93
Pseudotsuga menziesii
Larix olgensis
Cathaya argyrophylla
84
Pinus armandi
Pinus banksiana
Cedrus deodara
Picea smithiana
Keteleeria evelyniana
Abies holophylla

图4 基于 rbcL-accD 基因片断的 PCR-RFLP 分析，运用 PAUP(version 3.1.1, Swofford, 1993) 的分支界限法构建的最简约 Wagner 树，其步长为 72, CI = 0.750, HI = 0.250, RI = 0.526, RC = 0.395。分枝上的数值示利用自助法分析 (Bootstrap analysis) 检验某一分枝在 100 次重抽样分析结果中出现的次数(仅列出大于 50 的数值)。

Fig. 4 The most parsimonious Wagner tree generated by the branch-and-bound option of PAUP (version 3.1.1, Swofford, 1993) using PCR-RFLP analysis of the rbcL-accD gene fragment. The tree has 72 steps, with CI = 0.750, HI = 0.250, RI = 0.526 and RC = 0.395. Numbers above the branches indicate the percentage of times that the branch was recovered in 100 bootstrap replications. Bootstrap values below 50 are not reported.

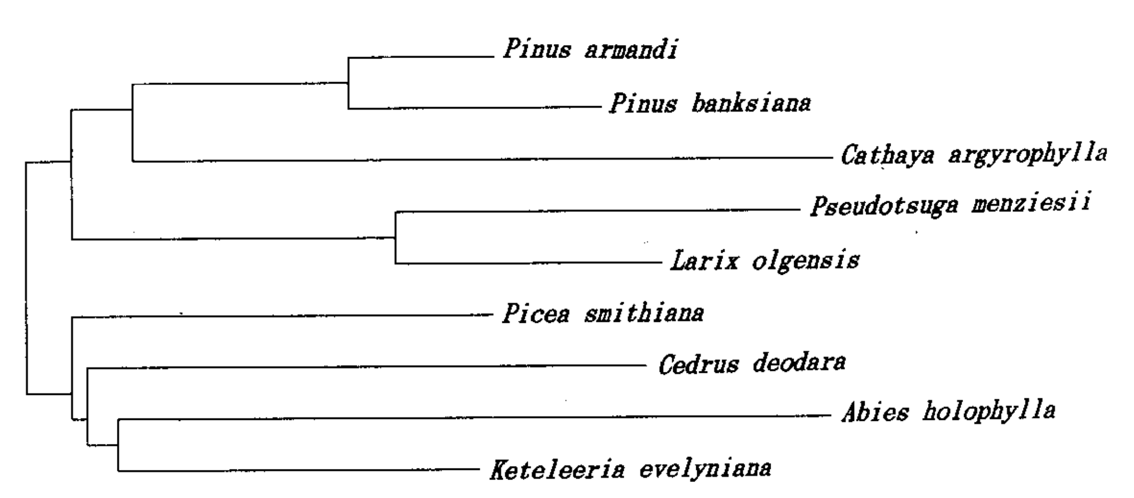


图5 基于 rbcL-accD 基因片断的 PCR-RFLP 分析，由 Neighbor-Joining 方法构建的松科 8 属、9 种植物的树系图

Fig. 5 The neighbor-joining tree of nine species of eight genera in the Pinaceae constructed from PCR-RFLP analysis of the rbcL-accD gene fragment.

3 讨 论

3.1 松科各属的孤立性

本研究虽仅涉及一长约 2550 bp 的 cpDNA 片断,但 86 个限制性内切酶位点中含 54 个变异位点,已占 63%。一般情况下,如此高的变异量对揭示系统发育关系极为有效,但本文分析的 54 个变异位点中,29 个位点的变异为自征,仅 25 个位点(占变异位点的 46%)对揭示系统发育关系有意义,这无疑反映了松科各属的孤立性,同时也是 Bootstrap 值偏低的原因之一。

3.2 银杉属的系统位置

银杉属的系统位置一直存在很大的争论:其胚胎发育、花粉形态、染色体数目和核型均接近于松属,木材解剖结果接近于黄杉属(王伏雄, 1990)。何关福等(1981)通过化学成分的研究,认为银杉属近缘于松属和云杉属,这一结论与 Hart(1987)的分支分析结果一致;Chen 等(1995)对银杉的胚珠结构和雌配子体发育进行了研究,认为银杉属和松属具有较近的亲缘关系。本文的 Wagner 简约树和 NJ 树均表明:黄杉属、落叶松属、银杉属和松属构成一个单系群,银杉属与松属的亲缘关系更近于与另外二属的亲缘关系,但这一结果未得到 Bootstrap 分析的较强支持。

3.3 落叶松属和黄杉属、冷杉属和油杉属的关系

落叶松属和黄杉属具有极近的亲缘关系(图 4 和图 5),冷杉属和油杉属具有较近的亲缘关系(图 5)。rbcL 基因序列分析(Chase *et al.*, 1993)和松柏类的 6 个 cpDNA 基因的 PCR-RFLP 分析(Tsumura, 1995)也得出这一结论。此外, Hart (1987)的分支分析和 Price 等(1987)的免疫学分析同样支持上述结论。

3.4 松科中的亚科划分问题

郑万钧和傅立国(1978)将松科划分为三个亚科——冷杉亚科、落叶松亚科和松亚科。在这一分类系统中,落叶松属、金钱松属和雪松属属于落叶松亚科; 冷杉亚科含油杉属、冷杉属、黄杉属、铁杉属、银杉属和云杉属;松亚科仅含松属。冷杉亚科和落叶松亚科的主要划分依据为枝是否分为长短枝。但是, Hart (1987) 的分支分析发现短枝这一性状在松科中至少起源了三次:一次在银杉属、松属和落叶松属中;一次在雪松属中;另一次在金钱松属中。短枝这一多次起源的性状作为亚科的划分标准显然是不合适的。从本文的 Wagner 简约树和 NJ 树上看,落叶松属和雪松属分别位于不同的支系中,冷杉亚科也不是一个单系群, Chase 等(1993) 和 Tsumura 等(1995)构建的分支图也不支持冷杉亚科和落叶松亚科为单系群,说明郑万钧和傅立国(1978)将松科分为冷杉亚科、落叶松亚科和松亚科的分类系统是不自然的。

参 考 文 献

王伏雄, 1990. 银杉生物学. 北京:科学出版社

何关福, 马忠武, 印万芬等, 1981. 银杉的锯齿烯族成分与系统位置的讨论. 植物分类学报, **19**: 440～442

郑万钧, 傅立国, 1978. 松科. 中国植物志, 第 7 卷. 北京:科学出版社

Chase M W, Soltis D E, Olmstead R G *et al.*, 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide

sequences from the plastid gene rbcL. Ann Missuri Bot Gard, **80**:528～586

Chen Z K, Zhang J H , Zhou F, 1995. The ovule structure and development of female gametophyte in *Cathaya* (Pinaceae). Cathaya , **7**: 165～176

Hart J A, 1987. A cladistic analysis of conifers: preliminary results. J Arn Arb, **68**:269～307

Hipkins V D, Tsai C H , Strauss S H, 1990. Sequence of the gene for the large subunit of ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase from a gymnosperm, Douglas fir. Plant Molecular Biology, **15**: 505～507

Kumar S, Tamura K , Nei M, 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Version 1.01. The pennsylvania State University, University Park, PA 16802

Price R A , Olsen-Stojkovich J, 1987. Relationships among the genera of Pinaceae: an immunological comparison. Systematic Botany, **12**:91～97

Rogers S O, Bendich A J, 1988. Plant Molecular Biology Manual. Belgium: Kluwer Academic Publishers, 1～10.

Swofford D L, 1993. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3. 1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois

Tsumura Y, Yoshimura K, Tomaru N *et al.*, 1995. Molecular Phylogeny of conifers using RFLP analysis of PCR-amplified specific chloroplast genes. Theor Appl Genet, **91**:1222～1236

Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S *et al.*, 1994. Loss of all ndh genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. Proc Natl Acad Sci USA, **91**: 9794～9798

《植物分类学报》参考文献引证格式

例 1：吴征镒,王荷生, 1983. 中国自然地理(上册). 北京:科学出版社, 32

例 2：吴征镒,1979. 论中国植物分区问题. 云南植物研究,**1**(1):1－22

例 3：额尔特曼著,王伏雄和钱南芬译,1962. 花粉形态与植物分类. 北京:科学出版社, 50－76

例 4：Abell B C, Tagg R C, Push M, 1954. Enzyme catalyzed cellular transamination. In: Round A F ed. Advances in Enzymology. Vol 2. 3rd ed. New York: Academic Press, 125－147

例 5：Grant V. 1963. Origin of Adaptation. New York: Columbia University Press, 1－5

例 6：Abell B C ,1945. The examination of cell nuclei. Biochem J, **35**: 123－126

说明：1. 在论文中标引参考文献:(1) 1～2 个著者的文献酌情用"吴征镒(1979)或(吴征镒, 王荷生, 1983)"的形式。(2)对3著者以上的文献, 用"(王文采等,1990)(Smith *et al.*, 1981)"的形式。如果两文献第一著者及年相同, 但其他著者有不同, 可加列著者以区别。(3) 引用同一著者在同一年出版的多篇文献时, 出版年后应用小写字母 a, b, c……区别。如 Kennedy W J, 1975a.(4)引用多篇文献时,按出版年由近至远依序排列。例:"早期研究工作者(Green, 1992; Smith, 1982; Tuck, 1899) 已经得出……。"

2. **论文末尾的参考文献表中**:(1)文献排列顺序为: 中日、西、俄。其中汉字可按姓氏笔划; 西、俄文按字母顺序。(2)著者3人以内的全部著录, 3人以上的只著录3人, 后加"等"或"*et al.*"。西文、俄文著者, 姓列名前,姓首字母大写;名缩写,首字母大写,不加缩写点。*et al.* 排斜体。(3)图书要写版次(初版不写)及出版社地点和出版社名,格式见例1及例5。(4)英文题目,第一字母大写余小写;书名每个实词首字母大写, 余小写。其他文种大小写按该文种习惯。(5)论文集里的论文引用见例4。其中,中文用"见:",英文用"In:";一个作者用 ed,多作者用 eds。(6)译文引用见例3。(7)每条参考文献首行顶格,余下行开头缩进2个中文字位置。(8)请注意标点符号(例1－例6),如"出版地点:出版社名,引文所在页"。